

0092

P-59

N-acetyl-L-cysteine による細胞内活性酸素種の生成

○岡本巧誠、米沢雄介、西岡 一  
(同志社大・バイオシステム研究室)

【目的】 N-acetyl-L-cysteine (NAC) は抗酸化剤として医薬品や化粧品に広く使用されているが、一方で変異原性・発がん性を有することが報告されている。NAC の毒性のメカニズムにおける活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) の関与を明らかにするため、我々が作製した大腸菌 ROS 消去系欠損株を用いる kat-sod Assay によって検討した。

【方法】 試験菌株として大腸菌 ROS 消去系欠損株である DSH7(wi/d), DSH19 (katEG), DSH56 (sodAB) を用いた。この 3 種の菌株を  $H_2O_2$  あるいは  $O_2^-$  増産剤で処理する際に 0 ～ 約 30mM の NAC を添加した場合についての ROS 消去能を比較した。また、NAC のみで処理した時の感受性を調べた。katG-lacZ 融合遺伝子をもつ DSH19, sodA-lacZ 融合遺伝子をもつ DSH56 を用いて  $\beta$ -galactosidase 活性を測定し、katG および sodA の遺伝子発現を観察した。

【結果】 3 菌株を  $H_2O_2$  あるいは  $O_2^-$  増産剤で処理する際に比較的の低濃度 (0 ～ 約 10mM) の NAC を添加すると明らかな ROS 消去能がみられた。また、3 菌株を NAC のみで処理したところ、比較的の高濃度 (約 15mM ～) において 3 菌株の間で明らかな感受性の差がみられ、細胞内 ROS 生成を示唆した。

0093

P-60 (O-5)

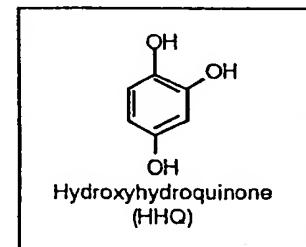
コーヒーに含まれるベンゼン活性代謝物

○平本一幸、李向紅、牧本光正、加藤哲太、菊川清見 (東京薬大・薬)

【目的】 我々はコーヒー中に DNA 鎮切断作用を有する成分が含まれることを見いだしている。今回、この DNA 鎮切断物質を単離し、ベンゼンの活性代謝物である hydroxyhydroquinone (HHQ) と同定したので報告する。

【方法・結果】 市販のインスタントコーヒーから DNA 鎮切断活性を有する物質を酢酸エチル・エタノールで抽出し、順相及び逆相クロマトにより精製した。MS, NMR, UV 吸収および HPLC により切断物質を、その遺伝毒性が既に明らかにされているベンゼン代謝物 hydroxyhydroquinone (HHQ) と同定した。HHQ は濃度、反応時間に依存して DNA を切断した。この切断は SOD では阻害されず、カタラーゼ、OH ラジカル消去剤、スピントラップ剤、キレート剤で阻害された。また鉄(II) イオンでは増強された。HHQ は水溶液中で溶存酸素を消費し、カタラーゼ添加により酸素濃度が増加したことから、コーヒー中の過酸化水素発生源は HHQ であることが明かになった。また、DMPO を用いた ESR-スピントラッピングにより DMPO-OH のシグナルが認められ、HHQ から OH ラジカルが発生することが明らかになった。

【結論】 コーヒー中の DNA 鎮切断物質として同定された HHQ は、ベンゼンの活性代謝物として知られており、*S. typhimurium* TA 97 と TA 100 に對して直接変異原性を示すと報告されている。コーヒー中の HHQ の存在はコーヒーの安全性を評価する上で、重要な問題と考えられる。



## **Benzene active metabolite contained in coffee**

- Kazuyuki HIRAMOTO, Xianghong LI, Mitsumasa MAKIMOTO, Tetsuta KATO, Kiyomi KIKUGAWA (School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences)

[Object] We have already found that an ingredient having DNA chain cleavage effect is contained in coffee. Here, we report that we have isolated this DNA chain cleavage substance and identified to be hydroxyhydroquinone (HHQ) that is an active metabolite of benzene.

[Method and Result] A substance having DNA chain cleavage activity was extracted from commercial instant coffee with ethyl acetate and ethanol, and purified by normal phase and reverse phase chromatography. Using MS, NMR, UV absorbance and HPLC, the cleavage substance was identified to be a benzene metabolite, hydroxyhydroquinone (HHQ), the genetic toxicity of which had been already revealed. HHQ cleaved DNA depending on the concentration and reaction time. The cleavage was not inhibited by SOD, but inhibited by catalase, an OH radical scavenger, a spin trapping agent and a chelating agent. Furthermore, the cleavage was enhanced by iron (III) ion. Since HHQ consumed the dissolved oxygen in the aqueous liquid and the concentration of oxygen was increased by addition of catalase, it was revealed that the source for generating hydrogen peroxide in coffee was HHQ. Furthermore, it was revealed that OH radical was generated from HHQ since a signal of DMPO-OH was observed by ESR-spin trapping using DMPO.

[Conclusion] HHQ, which was identified to be a DNA chain cleavage substance in coffee, is known as an active metabolite of benzene, and is reported to exhibit direct-acting mutagenicity against *S. typhimurium* TA 97 and TA 100. The existence of HHQ in coffee is considered to be an important problem for evaluating safety of coffee.